

## 様式 C-19

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年 5 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～2010

課題番号：21791998

研究課題名（和文） ヒト唾液腺腫瘍における TPX2 遺伝子の発現および機能解析

研究課題名（英文） Expression and functional analysis of TPX2 gene in human salivary gland tumors

研究代表者

重石 英生 (SHIGEISHI HIDEO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90397943

研究成果の概要（和文）：

唾液腺悪性腫瘍における TPX2 及び RHAMM の mRNA 発現は正常唾液腺における発現と比較して亢進していた。さらに、唾液腺癌細胞株において TPX2 及び RHAMM は細胞周期 M 期において、紡錘体微小管とほぼ同様の局在を示し、特に RHAMM は細胞周期 M 期においてその発現が増加することが明らかとなった。以上より唾液腺悪性腫瘍において、TPX2 や RHAMM の過剰発現が腫瘍の増殖に重要な役割を担うことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The mRNA expression of TPX2 and RHAMM was increased in malignant salivary gland carcinomas compared with that in normal salivary glands. Moreover, TPX2 and RHAMM expression was observed in the mitotic spindle at the mitotic stage of cell cycle. RHAMM expression was increased at the M phase of cell cycle. These results suggest that TPX2 and RHAMM play a significant role in growth of the tumor cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：細胞周期、悪性腫瘍、紡錘体形成

## 1. 研究開始当初の背景

細胞周期 M 期において、染色体と結合する紡錘体微小管は、セントロメア領域の表層に形成された動原体に付着して、動原体微小管を形成する。近年、ヒト動原体を構成する蛋白質がいくつか同定されている。そのなかでも、CENP-H (Centromere Protein H) は M 期において動原体に局在し、M 期中期における染色体の配列、動原体微小管の形成や後期における染色体の両極への分配において重要な役割を担うという報告がなされてきた。我々は既に、口腔扁平上皮癌での CENP-H mRNA の発現が正常歯肉に比較して亢進しており、CENP-H の過剰発現とその遺伝子発現が腫瘍の増殖活性と相関していることを報告してきた (Oncol Rep. 2006;16:1071-5) 。さらに唾液腺悪性腫瘍においても CENP-H mRNA の過剰発現と腫瘍の増殖活性との関係も報告してきた (Oral Sci Int. 2008;5 : 43-51) 。このことは、CENP-H 遺伝子が唾液腺悪性腫瘍の増殖において重要な役割を担っていることを示唆するものである。さらに、近年、ヒトの細胞周期 M 期における紡錘体微小管形成に重要な役割を担う遺伝子として TPX2 (the targeting protein for Xenopus kinesin-like protein 2) が同定された。ヒトの細胞周期 M 期には、すべての染色体が微小管と両極性に結合し、異常な染色体分配が生じないようにするために、細胞周期の進行を制御する機構として紡錘体形成チェックポイントが存在する。この機構において TPX2 は Aurora kinase によりリン酸化されることによって、細胞周期の進行を制御していると考えられている。さらに、RHAMM (receptor for hyaluronan-mediated motility) はヒアルロン酸の受容体として同定された蛋白質

で、細胞内においても細胞周期のシグナル伝達や微小管の形成に関与し、TPX2 とともに微小管の形成において重要な役割を担っていると考えられる。しかしながら、現在のところ、悪性腫瘍での TPX2 の機能は不明な点が多く、特に、唾液腺腫瘍における TPX2 の機能はいまだ明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

唾液腺腫瘍における TPX2 の発現を明らかにする目的で、当科にて手術時に摘出した唾液腺腫瘍における TPX2 の発現と臨床病理学的指標や転移および予後との関わりについて検討する。これにより、TPX2 が CENP-H と同様に唾液腺悪性腫瘍の増殖と関係しているかどうかをまず明らかにする。次に、当科にて樹立した唾液腺腫瘍細胞株を用いて、TPX2 遺伝子の機能や紡錘体形成チェックポイント機構における RHAMM や Aurora kinase との関係についての解析を行う。唾液腺腫瘍において、TPX2 の過剰発現や機能消失が、細胞周期制御の異常につながるかどうかを明らかにすることを目標とする。

## 3. 研究の方法

- (1) 広島大学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会による承認の下で、広島大学病院口腔顎顔面再建外科にて切除し、患者による同意が得られた唾液腺腫瘍症例の新鮮凍結材料を用いて、RNA を抽出し、Real time RT-PCR 法により、TPX2 mRNA の発現解析を行う。
- (2) 唾液腺腫瘍症例のパラフィン包埋切片を用いて、免疫組織学的に TPX2 の発現検索を行う。また、腫瘍の増殖活性を明らかにする目的で、免疫組織学的に

PCNA および Ki-67 の発現を検索し、TPX2 の発現との相関性についても検討する。

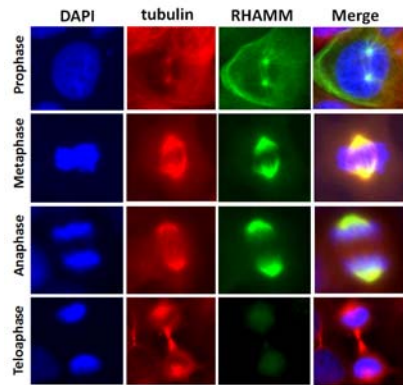
- (3) 唾液腺腫瘍細胞株を用いて、細胞周期における TPX2 の機能解析および RHAMM との関連について検討を行う。

#### 4. 研究成果

当科にて口腔扁平上皮癌における TPX2 の発現解析を行った結果、口腔扁平上皮癌での TPX2 mRNA の発現は正常歯肉に比較して亢進していた。また口腔扁平上皮癌においては、TPX2 mRNA の発現レベルと RHAMM mRNA の発現レベルは相関していることが判明した (International Journal of Oncology, 2009) 。このことは、RHAMM が細胞周期の進行に重要な役割を担う可能性を示唆するものである。今回、唾液腺腫瘍における TPX2 の発現を明らかにする目的で、当科にて手術時に摘出した唾液腺腫瘍における TPX2 の発現と臨床病理学的指標や転移および予後との関わりについて検討した。その結果、TPX2 の過剰発現と、その遺伝子発現と腫瘍の増殖活性との間に相関関係を認めた。このことは、TPX2 遺伝子が唾液腺悪性腫瘍の増殖において重要な役割を担っていることを示唆するものである。また、TPX2 の高い発現は、悪性腫瘍における細胞分裂の増加や細胞周期制御の異常を示すだけでなく、TPX2 の過剰な発現が、悪性転化にも関わっている可能性を示唆している。今回、唾液腺腫瘍において TPX2 遺伝子の過剰発現が明らかとなったことは臨床病理学的にも大変意義のあるものであると考えられる。

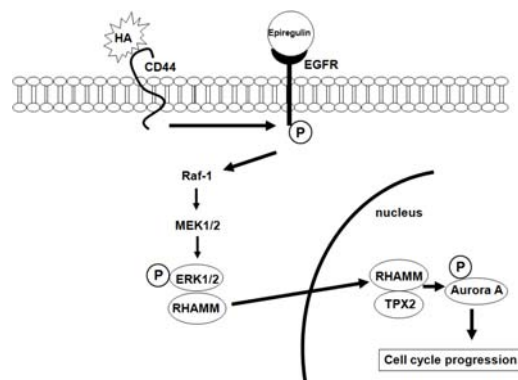
さらに唾液腺腫瘍由来細胞 (HTB-41) を用いた研究より、RHAMM は細胞周期M期において発現増加を認め (図 1) 、RHAMM は紡

錘体とほぼ同様の局在を示し、細胞周期 M 期の進行を制御することが明らかとなった。



(図 1: 細胞周期M期における RHAMM の局在)

さらに、骨形成性線維腫由来細胞を用いた研究より、RHAMM は ERK1/2 kinase のリン酸化に関与し、TPX2 とともに複合体を形成することにより、細胞周期 M 期の進行を制御することが明らかとなった (Hatano, Shigeishi et al. Lab Invest, 20010) 。さらに、RHAMM ノックダウンにより、AuroraA のリン酸化が抑制されたことから、RHAMM は AuroraA を介して細胞周期 M 期の進行を制御することが示唆された (図 2) 。このことは、RHAMM がヒアルロン酸の受容体として機能するのみでなく、腫瘍の増殖に重要な役割を担うことを示唆するものである。



(図 2: TPX2 及び RHAMM の機能)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Hatano H, Shigeishi H, Kudo Y, Higashikawa K, Tobiume K, Takata T, Kamata N. RHAMM/ERK interaction induces proliferative activities of cementifying fibroma cells through a mechanism based on the CD44-EGFR. Lab Invest 2011. (in press) (査読有り)
2. Ohta K, Nishi H, Fukui A, Shigeishi H, Takechi M, Kamata N. CX3CL1 expression induced by Candida albicans in oral fibroblasts. FEMS Immunol Med Microbiol. Nov;60(2):179-185, 2010. (査読有り)
3. Ohta K, Ogawa I, Ono S, Taki M, Mizuta K, Miyauchi M, Takechi M, Shigeishi H, Takata T, Kamata N. Histopathological evaluation including cytokeratin 13 and Ki-67 in the border between Lugol-stained and -unstained areas. Oncol Rep. Jul; 24(1):9-14, 2010. (査読有り)
4. Shigeishi H, Yamaguchi S, Mizuta K, Nakakuki K, Fujimoto S, Amagasa T, Kamata N. Amphiregulin induces proliferative activities in osseous dysplasia. J Dent Res 88(6):563-568, 2009. (査読有り)
5. Shigeishi H, Fujimoto S, Hiraoka M, Ono S, Taki M, Ohta K, Higashikawa K, Kamata N. Overexpression of the receptor for hyaluronan-mediated motility, correlates with expression of microtubule-associated protein in human oral squamous cell carcinomas. Int J Oncol 34(6):1565-1571, 2009. (査読有り)
6. Higashikawa K, Yoneda S, Tobiume K, Saitoh M, Taki M, Mitani Y, Shigeishi H, Ono S, Kamata N. DeltaNp63alpha-dependent expression of Id-3 distinctively suppresses the invasiveness of human squamous cell carcinoma. Int J Cancer. Jun 15;124(12):2837-2844, 2009. (査読有り)

7. Shigeishi H, Ohta K, Hiraoka M, Fujimoto S, Minami M, Higashikawa K, Kamata N.

Expression of TPX2 in salivary gland carcinomas. Oncol Rep 21(2):341-344, 2009.

(査読有り)

[学会発表] (計 3 件)

1. Hiroko Hatano, Hideo Shigeishi, Yasusei Kudo, Takashi Takata, Nobuyuki Kamata. RHAMM induces proliferative activities of cementifying fibroma cells. The 88th General Session of the IADR in Barcelona, Spain on July 17, 2010.
2. Hideo Shigeishi, Koichiro Higashikawa, Hiroko Hatano, Kei Tobiume, Nobuyuki Kamata. PGE2-induced expression of NR4A2 confers anti-apoptotic capability. The 88th General Session of the IADR in Barcelona, Spain on July 16, 2010.
3. 重石 英生, 東川 晃一郎, 波多野 寛子, 田中 扶美, 小野 重弘, 鎌田 伸之. ヒト口腔扁平上皮癌におけるNR4A2の発現および機能解析. 第64回日本口腔科学会総会・学術集会, 札幌, 2010年6月24日.

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重石 英生 (SHIGEISHI HIDEO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号: 90397943

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: